

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
10. Jg. 1972, S. 434–437

Quantitative Chrombestimmung im Harn mit flammenloser Atomabsorptions-Spektrometrie

Von K.-H. SCHALLER, H.-G. ESSING, H. VALENTIN und G. SCHÄCKE

*Aus dem Institut für Arbeits- und Sozialmedizin und der Poliklinik für Berufskrankheiten
(Direktor: Prof. Dr. H. Valentin) der Universität Erlangen-Nürnberg*

(Eingegangen am 22. Oktober 1971/17. Juli 1972)

Sowohl für die Prävention als auch bei bereits bestehenden Gesundheitsstörungen Chrom-exponierter Werktätiger ist der Nachweis des Metalls im biologischen Material von arbeitsmedizinisch-toxikologischem Interesse. Darüber hinaus gewinnen Chromuntersuchungen auch im Bereich der Stoffwechselforschung zunehmend an Bedeutung. Zur Bestimmung des Chroms im Harn bietet sich als Methode der Wahl die flammenlose Atomabsorptions-Spektrometrie an. Sie ermöglicht im Unterschied zur herkömmlichen Atomisierungsmethode in einer Flamme neben weiteren Vorteilen Metallanalysen ohne vorheriges Aufarbeiten der Proben. Bei 60 beruflich nicht Chrom-exponierten Personen fanden wir eine mittlere normale Chromausscheidung im Harn von $1,8 \pm 1,1 \mu\text{g/l}$. Als obere Normgrenze errechnete sich eine Chromausscheidung von $4,6 \mu\text{g/l}$ Harn ($p < 0,01$).

The quantitative determination of urinary chromium by flameless atomic absorption spectrometry

For preventive purpose and in view of the disturbances of health already observed in workers exposed to chromium, the detection of this metal in biological material is of great interest in the field of toxicology in occupational medicine. In addition, general studies on the role of chromium in human metabolism are becoming more important. Flameless atomic absorption spectrometry seems to be the most suitable method for the determination of chromium in body fluids. Unlike customary flame atomizing methods, this method, amongst other advantages, permits the analysis of metals without prior preparation of the specimen. On 60 persons not exposed to chromium we found a mean urinary chromium elimination of $1.8 \pm 1.1 \mu\text{g/l}$. The upper normal value was $4.6 \mu\text{g/l}$ urine ($p < 0.01$).

Chrom und seine Verbindungen kommen in vielen industriellen Fertigungsbereichen zur Anwendung. Hier sind insbesondere die Galvanotechnik, die chemische Industrie, die Textilfärberei, die Gerberei und die Zementherstellung zu nennen. Der berufliche Umgang mit diesem Metall kann zu Gesundheitsschäden führen, die pathogenetisch durch die allgemein toxische Schadenspotenz und Kanzerogenität zahlreicher Chromverbindungen sowie deren allergisierende Wirkung bedingt sind (Lit. bei 1). Daher ist sowohl für die Prävention als auch bei bereits bestehenden Gesundheitsstörungen der Nachweis des Metalls im biologischen Material chrom-exponierter Werktätiger von arbeitsmedizinisch-toxikologischem Interesse.

Die hierfür eingesetzten chemischen Bestimmungsmethoden werden zunehmend durch physikalisch-chemische Verfahren, insbesondere durch die Atomabsorptions-Spektrometrie ersetzt (2, 3). Diese zeichnet sich durch hohe Spezifität, leichte und schnelle Durchführbarkeit und größere Genauigkeit aus (4, 5).

In der klassischen Atomabsorptions-Spektrometrie reichen häufig, bedingt durch das Zerstäuber-Brenner-System, die Nachweisgrenzen zur Metallbestimmung in biologischen Materialien nicht aus. Nach WELZ et al. (6) sind für die Durchführbarkeit dieses Analysenverfahrens zwei Voraussetzungen erforderlich.

1. Entweder müssen für geringe Metallkonzentrationen größere Probenvolumina zur Verfügung stehen, so daß

aus diesen die benötigten Konzentrationen durch Anreicherungsverfahren gewonnen werden können;

2. oder bei Vorhandensein nur geringer Probenmengen muß das zu analysierende Element in ausreichend hoher Konzentration vorliegen.

Um diese Einschränkungen der Flammen-Atomabsorptions-Spektrometrie zu umgehen, ist es notwendig, anstelle des Zerstäubers andere Systeme zu verwenden. Dabei ging man hinsichtlich einer Dissoziation der Atome neue Wege, indem man die Flamme durch andere Energiequellen ersetzte. Hierfür kommen etwa Hohlkathoden, Graphitöfen oder Laserstrahlen in Betracht (7). Von L'VOV (8) und MASSMANN (9) sind Kohle- bzw. Graphitrohre als Absorptionsküvetten beschrieben worden. Die Probe wird in flüssiger oder in fester Form in ein Kohle- oder Graphitrohr eingebracht und durch einen elektrischen Lichtbogen bzw. eine elektrische Widerstandsheizung verdampft. Bei schneller Atomisierung kleiner Proben läßt sich erreichen, daß fast alle Atome der Probe in dem nutzbaren Absorptionsvolumen vorhanden sind (9). Auf diese Weise kommt man im allgemeinen mit einem Tausendstel der Konzentration aus, die man bei Verwendung einer Flamme benötigt.

Wie für zahlreiche Spurenelemente und Metalle bietet sich gerade für die quantitative Analyse von Chrom, das nicht nur arbeitsmedizinisch-toxikologisch bedeutsam ist, sondern auch als Metalloenzym eine essentielle

Rolle im Intermediärstoffwechsel spielt (10–16), die Methode der flammenlosen Atomisierung an.

Methodik

Die direkte Analyse des Chromgehaltes im Harn wurde mit dem Perkin-Elmer-Atomabsorptions-Spektrometer 305 vorgenommen, in das anstelle des konventionellen Zerstäuber-Brenner-Systems die Graphitrohrküvette HGA¹⁾ 70 eingebaut war.

Graphitrohrküvette

In einem elektrisch aufheizbaren Graphitrohr, das sich im Strahlengang des Atomabsorptions-Spektrometers befindet, wird die zu analysierende Probe nach kurzfristigem Trocknen und Veraschen durch zeitgesteuerte Temperatureinstellung atomisiert. Im Unterschied zur offenen Flamme des Brenner-Systems verweilen die freiwerdenden Atome im Graphitrohr oft länger als 1 s, d. h. fast tausendmal länger als in der offenen Flammenströmung. Die Atomisierung im Graphitrohr hat gegenüber dem Zerstäuber-Brenner-System mit offener Flamme folgende Vorteile:

1. Vorheriges Aufarbeiten des biologischen Materials entfällt bei vielen Metallanalysen, da Trocknung, Veraschung und Atomisierung durch variable Temperatureinstellung in einem Arbeitsgang erfolgen.
2. Es werden geringere Konzentrationen erfaßt, da im Graphitrohr erheblich mehr Atome zur Lichtabsorption angeregt werden.
3. Zur Analyse ist wesentlich weniger Untersuchungsmaterial erforderlich.
4. Die Analyse leicht oxidbildender Elemente ist wegen der Inertgasatmosphäre im Graphitrohr weniger störanfällig.
5. Durch eine stufenlose Temperatureinstellung kann die optimale Atomisierungstemperatur für jedes Element gewählt werden.
6. Unerwünschte Begleitsubstanzen der Matrix können zeitlich vor der eigentlichen Atomisierung durch stufenweises Erhöhen der Graphitrohrtemperatur zerstört werden.

Abbildung 1 zeigt einen schematischen Querschnitt der Graphitrohrküvette HGA 70. Bezüglich weiterer apparativer Details darf auf die Betriebsanleitung der Herstellerfirma Perkin-Elmer und auf die Veröffentlichung von WELZ et al. (6) verwiesen werden.

Untersuchungsgang

Als Probenmaterial wurden jeweils 50 µl eines 24-h-Sammelharns mit einer Eppendorf-Mikropipette durch die Einspritzöffnung der Küvette direkt in das Graphitrohr eingegeben. Entsprechend der

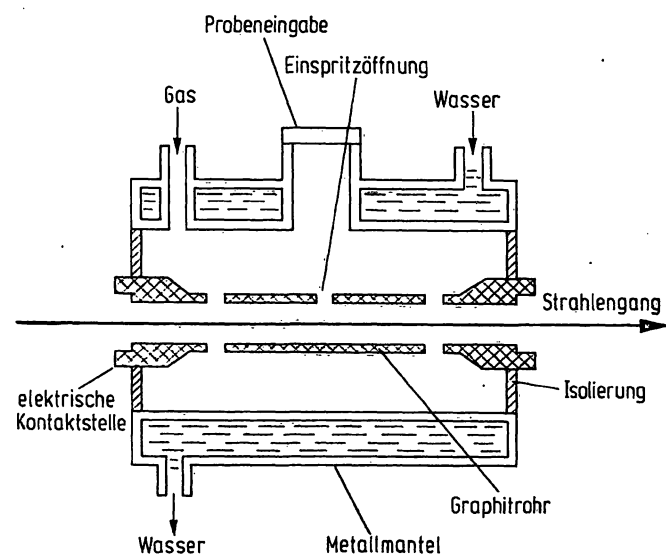


Abb. 1

Schematischer Querschnitt der Graphitrohrküvette HGA 70

¹⁾ Heated Graphite Atomizer.

Tab. 1
Angaben für die Temperatur- und Zeitwahl zur Chrombestimmung im Harn

	Temperatur- u. Zeitwahl	Trocknung	Veraschung	Atomisierung
Schritt I	Temperatur	100°C	1100°C	—
	Zeit	120s	30s	—
Schritt II	Temperatur	—	1600°C	2600°C
	Zeit	—	30s	20s

Bedienungsanleitung für die HGA 70 wurde das Arbeitsprogramm 7 gewählt. Die fest eingestellten Graphitrohrtemperaturen bei diesem Programmschritt betragen für den Trockenvorgang 100°C und für den Veraschungsvorgang 1100°C. Getrocknet wurde 120 s und verascht zunächst 30 s. Da bei dieser Temperaturwahl die unerwünschten Harnkomponenten jedoch nicht vollständig thermisch zersetzt werden, wurde der Veraschungsvorgang mit der zum Atomisieren verfügbaren variablen Graphitrohrtemperatur um weitere 10 s erweitert. Hierbei betrug durch Einstellen einer Spannung von 5 Volt die Temperatur etwa 1600°C. Nach erneuter Veraschung über 30 s wurde 20 s bei einer Temperatur von etwa 2600°C nach einer Spannungswahl von 10 Volt atomisiert (Tab. 1). Die nach beiden Seiten geöffnete Küvette wurde durch einen konstanten Strom (1,5 l/min) mit Stickstoff gespült.

Für die atomabsorptions-spektrometrische Endpunktbestimmung wurden folgende *apparative Arbeitsbedingungen* gewählt:

Wellenlänge: 358 nm
Verstärkung: 5 Umdrehungen
Spaltbreite: 3

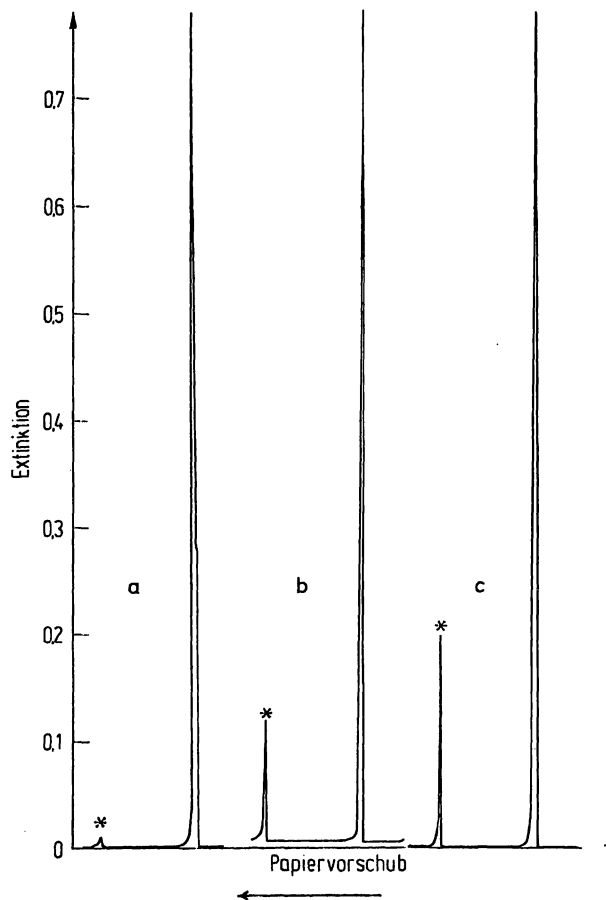


Abb. 2

Charakteristische Peaks (*) bei der Chrombestimmung im Harn. Normalurin bzw. Normalurin mit Chromzusatz
a) Normalurin, b) Normalurin + 25 µg/l, c) Normalurin + 50 µg/l

Ergebnisse und Diskussion

Eichkurve

Als Eichlösungen dienten wäbr. Kaliumchromatlösungen mit bekannten Konzentrationsstufen: 1 $\mu\text{g/l}$; 5 $\mu\text{g/l}$ und 10 $\mu\text{g/l}$ Chrom. Aufgegeben wurden jeweils 50 μl . Nach Ausmessen der Peak-Höhe wird an der linearen Eichkurve der Chromgehalt der Harnproben ermittelt. In Abbildung 2 sind die charakteristischen Peaks bei unterschiedlichem Chromgehalt des Harns graphisch dargestellt.

Prüfung der Zuverlässigkeitskriterien

Die *Spezifität* einer Elementanalyse mit der Graphitrohrküvette wird u. a. durch Rauch oder weitere nicht spezifische Absorptionen während des Atomisierungsvorganges beeinflusst. Durch das von uns modifizierte Veraschungsverfahren sind jedoch die für eine Rauchentwicklung während der Atomisierung verantwortlichen unerwünschten Harnbestandteile sicher thermisch zersetzt. Dies bestätigten auch vergleichende Untersuchungen mit und ohne Deuterium-Untergrundkompensation²⁾ (6). Die gemessenen Chrom-Peaks (*) zeigten eine gute Übereinstimmung (Abb. 3).

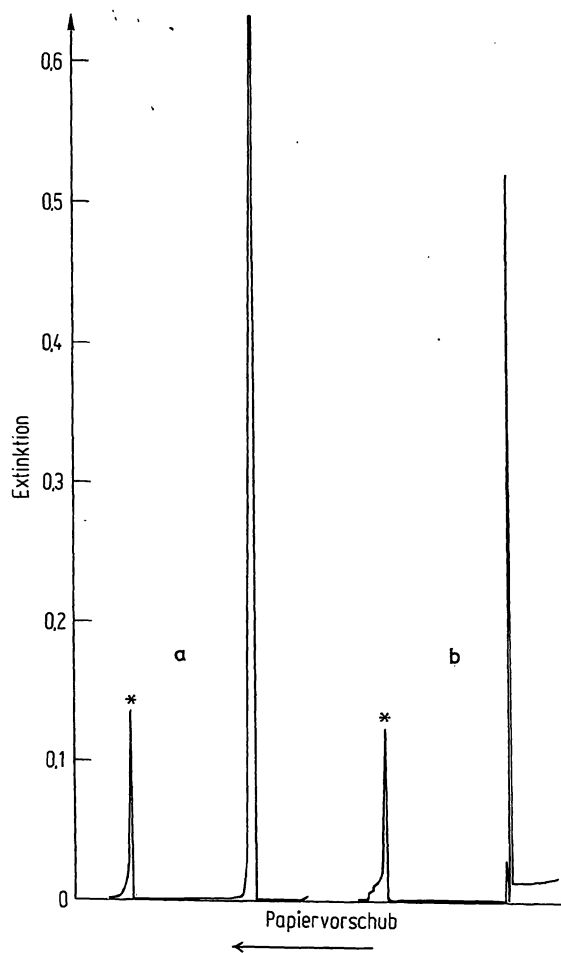


Abb. 3
Chrombestimmung im Harn mit flammenloser Atomabsorptionsspektrometrie

a) ohne, b) mit Deuterium-Untergrundkompensation

²⁾ Die Untersuchungen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. B. WELZ und Herrn E. WIEDEKING der Firma Bodenseewerk Perkin-Elmer, Überlingen, durchgeführt.

Zur Prüfung der *Richtigkeit* der Methode wurden Harnproben nicht Chrom-exponierter Probanden mit 5 $\mu\text{g/l}$ Chrom versetzt. Die mittlere Auffindungsrate betrug 93%.

Zur Bestimmung der *Präzision in der Serie* wurde eine Harnprobe 20mal analysiert. Bei einer mittleren Chromkonzentration von 6,02 $\mu\text{g/l}$ mit einer Standardabweichung von 0,9 $\mu\text{g/l}$ betrug der PEARSONSche Variabilitätskoeffizient $v = 15\%$. Die *Präzision von Tag zu Tag* über einen Zeitraum von einer Woche ergab einen Variabilitätskoeffizienten von $v = 17\%$.

Die *Nachweisgrenze* (bezogen auf 1% Absorption) betrug bei einer Probenmenge von 50 μl 0,2 $\mu\text{g/l}$ Harn bzw. absolut 10 pg Chrom.

Normalwerte

Von insgesamt 60 beruflich nicht Chrom-exponierten, klinisch gesunden Männern wurden Harnproben auf ihren Chromgehalt analysiert. Bei allen Personen stand der 24-h-Sammelharn zur Verfügung. Die mittlere Chromausscheidung betrug $1,6 \pm 1,1 \mu\text{g/d}$ und zeigte eine Normverteilung. Bezieht man diesen Chromgehalt auf 1 l Harn, so errechnet sich eine mittlere Chromkonzentration von $1,8 \pm 1,1 \mu\text{g/l}$. Dieser Wert liegt zwischen dem von SCHROEDER et al. (17) photometrisch mit 0,72 $\mu\text{g/l}$ Harn und dem von IMBUS et al. (18) ebenfalls photometrisch mit 3,77 $\mu\text{g/l}$ Harn angegebenen Ergebnis. Unter Berücksichtigung des von uns bei beruflich nicht Chrom-belasteten Personen ermittelten Normalwertes errechnet sich mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,01$ eine obere Normgrenze der Chromausscheidung von 4,6 $\mu\text{g/l}$ Harn.

Harnanalysen beruflich Chromexponierter

Harnproben von 12 in einer galvanotechnischen Abteilung beschäftigten Arbeitern wurden auf ihren Chromgehalt untersucht. Die Ergebnisse der einzelnen Analysen sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tab. 2
Ergebnisse von Chromanalysen im Harn zwölf beruflich chromexponierter Arbeiter

Proband	Chromgehalt im Harn [$\mu\text{g/l}$]
1	15,9
2	7,8
3	6,2
4	24,6
5	7,3
6	8,3
7	3,0
8	5,6
9	1,4
10	16,0
11	6,1
12	14,0

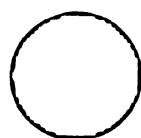
Praktische Schlußfolgerungen

Durch den Einsatz der Graphitrohrküvette HGA 70, welche die flammenlose atomabsorptions-spektrometrische Analyse von Spurenelementen und Metallen in

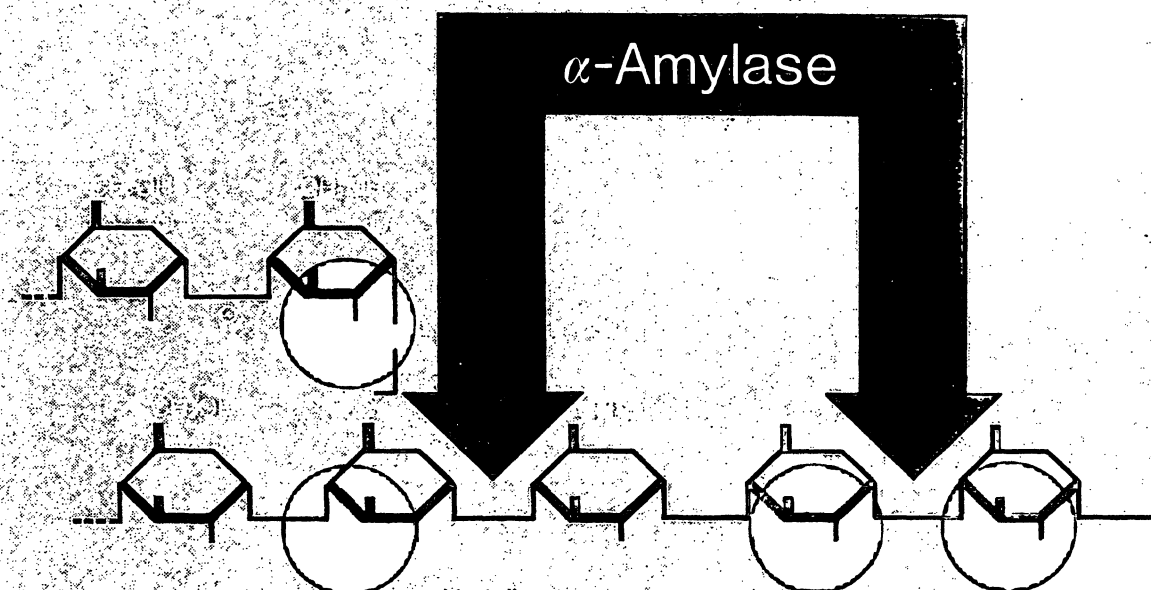
Neu!

α -Amylase
(Diastase)-Bestimmung
in Serum und Urin

DyAmyl



Amylopectin mit Reacton Rot
2B Geigy als Substrat



Vorteile:

- Gute Reproduzierbarkeit
- Linearität in weitem Bereich (bis 450 S. E.)
- Hohe Empfindlichkeit
- Farbentwicklung ohne Jod
- Stabilität des Endproduktes (ca. 24 Std.)
- Geringe Arbeitsbelastung

LABORDIAGNOSTICA
GÖDECKE

Gödecke Aktiengesellschaft · Berlin
Werk Freiburg
78 Freiburg, Postfach 569

MUTSCHLER

Arzneimittelwirkungen

Ein Lehrbuch der Pharmakologie für Pharmazeuten, Chemiker und Biologen. Mit einflussreichen Kapiteln in die Anatomie und Physiologie

Von Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. ERNST MUTSCHLER, Pharmazeutisches Institut der Universität Mainz

2., neubearbeitete und erweiterte Auflage 1972. Etwa XVI, 520 Seiten. Etwa 58 Abbildungen. Gr.-8°. Leinwand DM 54.-

Vor zwei Jahren erschien die 1. Auflage dieses neuen Pharmakologie-Lehrbuches für Pharmazeuten, Chemiker und Biologen. Innerhalb kurzer Zeit hat es eine außerordentliche Verbreitung unter den Apothekern, in der Pharmazeutischen Industrie, bei Medizinern und als Hochschullehrbuch erfahren. Dreimal mußte die erste Auflage nachgedruckt werden. In zahlreichen Besprechungen der medizinischen und pharmazeutischen Fachpresse und in der Beurteilung durch Hochschuldozenten wurden die hervorragende Didaktik, die gestraffte und trotz dem umfassende Darstellung, die Übersichtlichkeit und die wissenschaftliche Exaktheit hervorgehoben.

In die jetzt erscheinende 2., neubearbeitete und erweiterte Auflage wurden u. a. folgende Kapitel neu aufgenommen: Pharmakokinetik, Zentrale Muskelrelaxantien, Blutgruppen, Rh-Faktor, Prophylaxe und Therapie des Herzinfarkts. Medikamente, die am Respirationstrakt wirksam sind, wurden ebenso eingefügt wie die neue Arzneimittelgruppe der Immunsuppressiva. Alle übrigen Kapitel wurden auf den neuesten Stand gebracht, die Abbildungen z. T. erneuert und das Verzeichnis medizinischer Fachausdrücke ergänzt.

Urteile der Fachpresse

„Wenn man vor der Frage steht, das didaktisch hervorragende Buch zu empfehlen, so kann man kaum die Meinung des Autors beipflichten, das Buch sei nur für Pharmazeuten, Chemiker und Biologen geschrieben. Denn es wird auch dem Mediziner (Student und Praktiker) von größtem Nutzen sein. Man kann es vorbehaltlos empfehlen.“ (Ärztliche Forschung)

„Dieses neue Lehrbuch ist sehr sorgfältig und mit großem didaktischem Geschick geschrieben. Es kann allen naturwissenschaftlichen Studenten, aber auch Pharmazeuten und Chemikern, die irgendwelche Berührung mit der Pharmakologie haben, voll empfohlen werden.“ (Deutsche Medizinische Wochenschrift)

„The book should be found very helpful not only as a thorough introductory text of pharmacology and therapeutics but also for general reference use wherever German is read.“ (Unlisted Drugs)



WISSENSCHAFTLICHE VERLAGSGESSELLSCHAFT MBH, D-7000 Stuttgart 1, Birkenwaldstraße 44, Pf. 40



Walter de Gruyter Berlin · New York

Gitsch — Palmrich

Gynäkologisch-operative Anatomie

Einfache und erweiterte Hysterektomie · Ein Atlas

Anhang: Die Radioisotopen-Radikaloperation von Prof. Dr. med. Eduard Gitsch und Prof. Dr. Adolf Hans Palmrich. Mit Geleitworten von H. Hüsslein und I. Anreith. Bildteil von Hans Läng. 21 x 30 cm. VIII, 162 Seiten. Mit 200, z. Teil mehrfarbigen Abbildungen. 1972. Gebunden DM 180,- ISBN 3 11 008480 8

Der Atlas schließt eine immer spürbar gewesene Lücke zwischen anatomischen Lehrbüchern und den Darstellungen gynäkologischer Operationen. Anhand zahlreicher Illustrationen werden die durch die Operationstechnik bedingten Veränderungen der topographischen Anatomie des Genitales und seiner Nachbarorgane bei der vaginalen und abdominalen Hysterektomie beschrieben. In der Darstellung der Wertheim'schen Radikaloperation wird besonders der Anteil der Wiener gynäkologischen Schule an der Weiterentwicklung dieser Methode hervorgehoben.

Im Anhang wird die Radioisotopen-Radikaloperation beim Kollumkarzinom, die an der I. Universitäts-Frauenklinik Wien entwickelt wurde, beschrieben und illustriert (Typ 1: radioaktives Goldkolloid; Typ 2: radioaktiver Phosphor). Sie zeigt die Möglichkeiten auf, wie man die Resultate der Hysterektomie durch Zusatzmaßnahmen verbessern kann.

biologischem Material ermöglicht, wird das arbeitsmedizinisch-toxikologische Laboratorium um ein neues, zuverlässiges Verfahren bereichert. Bei der Bestimmung der Normwerte für Chrom im Harn betrug der Zeitaufwand für eine Einzelanalyse 5 Minuten. Im Unterschied zur Flammen-Atomabsorptions-Spektrometrie erklärt sich dieses Zeitersparnis dadurch, daß mit der Graphitrohrküvette vor der Atomisierung kein zeitintensives Aufarbeiten des biologischen Materials erforderlich ist. Weiterhin wird damit auch die Gefahr von Verunreinigung der Proben vermindert. Dieser Gesichtspunkt ist gerade für die Spurenanalyse bzw. Untersuchung von kleinsten Probenmengen bedeutsam.

Während für den Arbeitsmediziner die Pathogenese der Hypermetallose bei berufsbedingter Chrominkorporation im Vordergrund des wissenschaftlichen Interesses steht, ist für den Stoffwechselforscher die Frage der Chrommangel-Auswirkung auf den Organismus aktuell. Auch bezüglich dieser Fragestellung dürfte der Einsatz der Graphitrohrküvette in Verbindung mit modernen Anreicherungsverfahren wegen der niedrigen Nachweisgrenze der flammenlosen Atomabsorptions-Spektrometrie im Unterschied zur konventionellen Atomabsorptions-Spektrometrie von methodischem Vorteil sein.

Literatur

1. ESSING, H.-G., SZADKOWSKI, D. & VALENTIN, H. (1971), *Med. Sachverst.* 67, 35—39. — 2. FELDMAN, F. J., KNOBLOCK, E. C. & PURDY, W. C. (1967), *Anal. Chim. Acta* 38, 489—497. — 3. VÖLKL, A. (1971), *Zbl. Arbeitsmed.* 4, 122. — 4. PIRKE, K. M. & STAMM, D. (1970), *diese Z.* 8, 241—248. — 5. LEHNERT, G. & SCHALLER, K.-H. (1967), *Med. Welt* 18, 1131—1133. — 6. WELZ, B. & WIEDEKING, E. (1970), *Z. Anal. Chem.* 252, 111—170. — 7. MEICHSSNER, A. U. (1969), *Inaugural-Dissertation*, Erlangen. — 8. L'VOV, B. V. (1961), *Spectrochim. Acta*, Part B, 17, 761. — 9. MASSMANN, H. (1967), *Chimia* 21, 217—225. — 10. SCHWARZ, K. & MERTZ, W. (1959), *Arch. Biochem. Biophys.* 85, 292—295. — 11. CAMPBELL, W. J. & MERTZ, W. (1963), *Amer. J. Physiol.* 204, 1028—1030. — 12. CHRISTIAN, G. D., KNOBLOCK, E. C., PURDY, W. C. & MERTZ, W. (1963), *Biochim. Biophys. Acta* 66, 420—423. — 13. SCHROEDER, H. A., BALASSA, J. J. & VINTON, W. H. jr. (1965), *J. Nutr.* 86, 51—66. — 14. MERTZ, W. (1967), *Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol.* 26, 186—193. — 15. ROGGENSKI, E. E. & MERTZ, W. (1967), *Fed. Proc.* 26, Abstract 255, 301. — 16. SCHROEDER, H. A., NASON, A. P. & TIPTON, I. H. (1970), *J. Chron. Dis.* 23, 123—142. — 17. SCHROEDER, H. A., BALASSA, J. J. & TIPTON, I. H. (1962), *J. Chron. Dis.* 15, 941—964. — 18. IMBUS, H. R., CHOLAK, J., MILLER, L. H. & STERLING, T. (1963), *Arch. Environ. Health* 6, 286—295.

Prof. Dr. H. Valentin
8520 Erlangen
Schillerstr. 25—29